Die Wirkung von FU auf Chinesische Hamsterzellen

Josef Markus Mayerhofer

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0046

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der
Universität München
Direktor: Professor Dr. Otto Hug

Die Wirkung von FU auf Chinesische Hamsterzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Josef Markus M a y e r h o f e r

aus Vilsbiburg

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. med. K.-R. Trott
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wilmanns
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. K.R. Trott für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen, die zum Gelingen meiner Dissertation wesentlich beitrugen, sowie für seine Hilfe und Erfahrung, die er mir jederzeit zur Verfügung stellte.

Herrn Professor Dr. Otto Hug danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchzuführen, sowie für die sorgfältige kritische Durchsicht des Rohentwurfes meiner Dissertation.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frl. H. Pfeifer sowie allen Mitarbeitern des Strahlenbiologischen Institutes, die meine Versuche freundlicherweise unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Zytostatikum	3
2.2.	Zellkultivierung	3
2.2.1.	Zelltyp	3
2.2.2.	Medium	3
2.2.3.	Arbeitsmaterial, Arbeitsplatz	5
2.2.4.	Passage	5
2.2.5.	Kolonieausbeute	6
2.3.	Durchführung der Versuche	7
3.	Ergebnisse	9
3.1.	Zeit-Effekt-Beziehung bei jeweils konstanter Konzentration	9
3.2.	Konzentration-Effekt-Beziehung bei jeweils konstanter Expositionszeit	10
4.	Diskussion	34
4.1.	Vorwort	34
4.2.	Entdeckung	34
4.3.	Synthese	35
4.4.	Physikalische und chemische Eigenschaften	36
4.5.	Metabolismus und Tumorselektivität des FU	37
4.6.	Beeinflussung der DNA-Synthese durch 5-FU	38
4.7.	FU-Einfluß auf die RNA-Synthese	40

4.8.	FU-Einfluß auf die Ribosomensynthese	40
4.9.	FU-Einbau in die RNA	41
4.10.	FU-Einfluß auf den RNA-Code	41
4.11.	FU und Zellzyklus	42
4.12.	Klinische Anwendung	42
4.13.	Klinische Pharmakologie	44
4.14.	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
4.15.	Fehlermöglichkeiten	46
4.16.	Das Produkt aus Konzentration und Expositionszeit	48
5.	Zusammenfassung	53
Literatur		54

1. Einleitung

Neben den schon fast klassisch zu bezeichnenden Methoden der Krebsbekämpfung, dem "Strahl und dem Stahl", gilt in jüngster Zeit sowohl das wissenschaftliche als auch das klinische Interesse mehr und mehr der Chemotherapie von Tumoren mit zellwachstumshemmenden Medikamenten.

Während in der Klinik, aus der Notwendigkeit heraus, jede hoffnungsträchtige Möglichkeit für Tumorpatienten zu nutzen, diese Mittel schon auf breiter Basis Anwendung finden, ist die Forschung noch bemüht, exakte Grundlagen zur Wirkungsweise und Anwendungsart der klinisch bewährten Zytostatika zu liefern, um deren Anwendungsmöglichkeiten voll auszuschöpfen und ihren Gebrauch zu optimieren. In diesem Sinne wurden bereits für die meisten der gängigen Chemotherapeutika Untersuchungen über ihren Wirkmechanismus und ihren Angriffspunkt im Zellzyklus durchgeführt. Auch wurden Überlebenskurven verschiedener Zellinien nach Behandlung mit unterschiedlichen Zytostatika erstellt (Mauro and Madoc-Jones, 1970; Bhuyan et al., 1972).

Die Tatsache, daß gerade auch für das in dieser Arbeit ausgewählte Mittel im klinischen Gebrauch eine Reihe sehr unterschiedlicher Dosierungsschemata existiert, macht jedoch deutlich, daß diesbezüglich experimentelle Erkenntnisse zur Abklärung und Untermauerung eines optimal effektiven Verabreichungsmodus bislang fehlen. Zwar ist die Höchstdosis von Einzelverabreichungen der verschiedenen Zytostatika aufgrund der limitierenden Systemtoxizität weitgehend bekannt, doch wurden noch wenig Aussagen über sinnvolle Fraktionierung und vor allem über die Relation der Konzentration des Zytostatikums im

Tumorgewebe zu dessen Einwirkdauer auf dasselbe bezüglich des zytostatischen Effektes gemacht (Mellett, 1975).

Letzteres soll in dieser Arbeit an Hand eines in-vitro-Modells aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zytostatikum

Als Zytostatikum wurde der Antimetabolit 5-Fluoruracil verwandt. Seine Eigenschaften und möglichen Wirkmechanismen werden im Zusammenhang mit der Diskussion erläutert.

2.2. Zellkultivierung

2.2.1. Zelltyp

Die Versuche wurden mit Chinesischen Hamsterzellen B-14-FAF 28 (Ford and Yerganian, 1958) durchgeführt, deren Chromosomensatz aus 22 Chromosomen gebildet wird. Die Zellen teilen sich alle 12 Stunden und müssen zweimal pro Woche in neues Medium überführt werden.

2.2.2. Medium

Dieses bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium + Hank's Salzlösung (Tab. 1). Der Nährlösung wurden 10 % Kalbserum zugesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung und Herstellung des verwendeten Nährmediums

Die Nährlösung bestand aus Eagle's Minimum Essential Medium + Hank's Salze in Pulverform. Eine Ampulle zu 10,7 g enthielt:

Zusammensetzung	mg/l	Zusammensetzung	mg/l
Hank's Salze:			
NaCl	8000	L-Methionin	15
Na_2HPO_4: 2 H_2O	60	L-Phenylalanin	32
KCl	400	L-Thyreonin	48
KH_2PO_4	60	L-Tryptophan	10
$MgSO_4$: 7 H_2O	200	L-Tyrosin	36
$CaCl_2$ wasserfrei	140	L-Valin	46
Glucose	1000	Cholinchlorid	1
Phenolrot	10	Folsäure	1
		i-Inosit	2
Eagle's Minimum		Nicotinamid	1
Essential Medium:		D-Pantothensäure-	1
L-Arginin	105	Ca-Salz	
L-Cystin	24	Pyridoxal HCl	1
L-Glutamin	292	Riboflavin	0,1
L-Histidin	31		
L-Isoleucin	52,5		
L-Leucin	52,4		
L-Lysin	58		
Thiamin HCl	1		

Der Inhalt einer Ampulle wurde mit 350 mg $NaHCO_3$, 2 ml 1n NaOH und 100 mg Neomycinsulfat in einem Liter Aqua dest. gelöst und mittels einer Passage durch einen Bakterienfilter sterilisiert.

2.2.3. Arbeitsmaterial, Arbeitsplatz

Die Zellkultivierung wurde in Vierkantflaschen aus Glas (Schott) durchgeführt, welche sich mittels Aluminiumfolie verschließen lassen. Alle bei der Zellkultivierung benötigten Behältnisse, Arbeitsgeräte und Lösungen mußten steril sein. Die relative Keimfreiheit des Arbeitsplatzes wurde durch eine Reinluftbank gewährleistet, die in den Arbeitspausen UV-bestrahlt wurde. Konsequentes Abflammen der Behältnisöffnungen während des Arbeitsprozesses verminderte die Gefahr von Pilzinfektionen der Kulturen, welche trotzdem gelegentlich unvermeidbar waren.

2.2.4. Passage

Bei der Passage der Zellen in frisches Medium wurde folgendermaßen vorgegangen:
Das alte Medium, welches sich auf der 3-4 Tage alten Zellkultur befand, wurde abgegossen und verworfen. Anschließend ließ man 5 ml einer Ca^{++}-freien Salzlösung 5 min lang bei 37°C auf die am Boden der Vierkantflasche haftenden Zellen einwirken. Nach Abgießen der Salzlösung war das Ca^{++} weitgehend aus dem Zellrasen ausgewaschen, sodaß die nun folgende Trypsinbehandlung ihre Wirkung entfalten konnte.

Man ließ 2 ml einer 0,25 %igen Trypsinlösung für 7 min bei 37°C auf den Zellrasen einwirken. Die Zellen lösten sich dadurch vom Flaschenboden ab und schwammen frei in der Trypsinlösung. Die so gewonnene Zellsuspension wurde 1 : 10 mit Nährlösung verdünnt. Die Zellzahl pro ml in dieser verdünnten Zellsuspension wurde sodann mittels

einer Bürkerzählkammer bestimmt. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen konnte man aufgrund des Zählergebnisses beliebige Zellkonzentrationen erhalten.

Für die einfache Passage zur Weiterführung der Zellkultur wurden 50 000 bis 150 000 Zellen zusammen mit 10 ml Nährmedium in je eine Vierkantflasche eingefüllt. Auch wurden Kulturflaschen angelegt, welche nur 200 Zellen enthielten. Die verschlossenen Flaschen kamen sodann in den Brutschrank zur Inkubation bei 37°C in einer feuchten 3 % Kohlendioxid-Luft-Umgebung.

Mit den Flaschen, welche hohe Zelleinsaaten enthielten, wurde nach 3-4 Tagen die Zellkultur in oben geschilderter Weise weitergeführt.

2.2.5. Kolonieausbeute

Die Flaschen mit 200 eingesäten Zellen wurden erst nach einer Woche dem Brutschrank entnommen. Die aus den 200 Zellen entstandenen, auch mit bloßem Auge sichtbaren Zellkolonien wurden mit Methylenblau angefärbt. Im Anschluß daran wurden alle in einer Flasche enthaltenen Kolonien, welche aus mehr als 50 Zellen bestanden, unter dem Stereomikroskop gezählt. Das Ergebnis dieser Zählung in Relation zur Zahl der eingesäten Zellen ergibt in Prozent ausgedrückt die Kolonienausbeute (PE-Wert, nach dem englischen Ausdruck: plating efficency). Diese ist ein Maß für die Zahl der klonogenen Zellen ebenso wie für die Genauigkeit, mit der bei der Zählung und Verdünnung vorgegangen wurde. Nicht zuletzt ist dieser Wert ein Parameter für etwaige Noxen, die während der Inkubation auf die Zellen eingewirkt haben. Letzteres macht

das PE-Verfahren für Versuche geeignet, wie sie im Folgenden beschrieben werden.

2.3. Durchführung der Versuche

Ziel meiner Versuche war es, die Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen nach unterschiedlicher Expositionszeit für verschiedene Konzentrationen von FU zu bestimmen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Die bei den Versuchen verwendeten Zellen wurden bei einer normalen Passage, wie sie oben schon beschrieben wurde, gewonnen.

In die verschiedenen Flaschen wurden, wie aus den Tabellen ersichtlich ist, jeweils 200 bis 5 000 Zellen in 10 ml Medium eingesät. Sie wurden sodann 4 Stunden bebrütet, um ein Anwachsen der Zellen am Flaschenboden zu erreichen. Einige Flaschen verblieben gleich für eine Woche im Brutschrank, um über den PE-Wert des jeweiligen Versuches Auskunft zu geben.

Die übrigen Kulturflaschen wurden nach 4 Stunden dem Brutschrank entnommen und es wurde dem Medium die jeweilige FU-Menge zugesetzt. FU wurde in Form der handelsüblichen Trockensubstanz zu 250 mg pro Ampulle verwendet und in Hank's Salzlösung (Tab. 1) gelöst. Pro Versuch wurden einigen Flaschen jeweils nur 0,3 ml FU-freie Hank's Salzlösung zugesetzt. Ansonsten wurden diese Flaschen gleich den anderen behandelt. Da in ihre Überlebensraten lediglich die Zellverluste durch die mechanische Behandlung eingingen, bilden sie in den Graphiken den Punkt mit 100 % relativer Überlebensrate.

Die Flaschen kamen dann für die Dauer der Expositionszeit in den Brutschrank zurück.

Nach deren Ablauf wurden sie erneut entnommen und das FU-haltige Medium abgegossen. Es erfolgte sodann eine Spülung mit Hank's Salzlösung, um eventuell zurückverbliebene Spuren von FU zu entfernen.

Nach Zugabe von jeweils 10 ml frischem Medium verblieben die Flaschen für 1 Woche im Brutschrank. Nach Ablauf derselben wurde mit Methylenblau gefärbt und nach den schon erwähnten Kriterien ausgezählt. Zelleinsaathöhe, FU-Konzentration, Behandlungsdauer und Überlebensraten sind den Tabellen zu entnehmen.

3. Ergebnisse

Eine Reihe langwieriger Vorversuche diente zur Ermittelung der erforderlichen FU-Konzentrationen sowie der benötigten Zelleinsaaten. Die häufige Widersprüchlichkeit der Resultate dieser Vorversuche veranlaßte mich aber auch, immer wieder Abänderungen am Versuchsaufbau vorzunehmen, um vermutete Störfaktoren auszuschließen. Schließlich wurde ein standartisiertes Schema zur Versuchsdurchführung entwickelt, nach dem ich gezielt sieben Versuche unterschiedlichen Umfangs durchführte, deren Ergebnisse in Tabelle 2 aufgeführt werden.

3.1. Zeit-Effekt-Beziehung bei jeweils konstanter Konzentration

Tabelle 3 ordnet die Überlebensraten bei unterschiedlichen Expositionszeiten den vier zur Anwendung gebrachten FU-Konzentrationen zu. Die Mittelwerte dieser Überlebensraten nebst ihren aus mehr als zwei Werten ermittelten Standardabweichungen wurden in Abbildung 2 bis 5 für die FU-Konzentrationen 0,02 mg/ml bis 0,05 mg/ml in halblogarithmischem Maßstab als Funktion der Expositionsdauer aufgetragen. Die Abnahme der Überlebensraten mit zunehmender Expositionsdauer folgt für alle vier Konzentrationen mehr oder weniger deutlich einer Exponentialfunktion. In Abbildung 6 sind die Kurven aus den Abbildungen 2 bis 5 zusammengefaßt. Diese Kurven wurden mit freiem Auge gezogen. Es wurden auch Kurven nach der linearen Regression berechnet. Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede (Exponent n zwischen 1,5 und 1,65). Im weiteren wurde von diesen Kurven ausgegangen.

Die Exponentialfunktionen werden mit zunehmender Konzentration steiler, die Expositionsdauer, die die Überlebensrate um 1/e vermindert (D_o), nimmt von 113 min bei 0,02 mg/ml auf 59 min bei 0,03 mg/ml, 35 min bei 0,04 mg/ml, 25 min bei 0,05 mg/ml ab.

3.2. Konzentration-Effekt-Beziehung bei jeweils konstanter Expositionszeit

Tabelle 4 ordnet die Überlebensraten bei unterschiedlichen Konzentrationen den Expositionszeiten 30 min, 60 min und 90 min zu. In den Abbildungen 7 bis 9 wurden die mittleren Überlebensraten bei konstanten Zeiten in Abhängigkeit von der Konzentration in halblogarithmischem Maßstab aufgetragen. Die Kurven wurden durch Punkte gelegt, die an den Kurven der Abbildung 6 abgelesen wurden. Somit ergeben sich Kurven, die in ihrem Anfangsteil einen flachen Verlauf zeigen, schließlich steiler werden, um sich dann einer Exponentialfunktion anzuschmiegen. Diese Kurven lassen sich entsprechend dem in der Strahlenbiologie üblichen Formalismus (Hug 1974) beschreiben. Dabei wird als D_o diejenige Dosis bezeichnet, die im geradlinigen, also exponentiellen Teil der Kurve die Zahl der jeweils noch lebenden Zellen auf 1/e (ca. 37 %) vermindert. Die D_q ergibt sich bei einer halblogarithmischen Darstellung aus dem Schnittpunkt der Verlängerung des geradlinigen Teils der Kurve mit der Überlebensrate 1 (Quasischwellendosis).
D_o und D_q sind unter den jeweiligen Abbildungen aufgeführt.

Tabelle 2: Aufführung der durchgeführten Versuche in chronologischer Reihenfolge und Darstellung der Ergebnisse.

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 178	100,3	-	-	200	194 202 206	200,7	-
		0,00	60	200	145 154 163	154,0	100,0
		0,02	30	500	259 283 295 304	285,3	74,1
		0,02	60	1000	297 371 372 438	369,5	48,0
		0,03	30	1000	297 312 325 326.	315,0	40,9

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 180	62,5	-	-	200	115 124 136	125,0	-
		0,00	60	200	97 98 99	98,0	100,0
		0,02	30	500	81 114 116	103,7	42,3
		0,02	60	500	28 46 58	44,0	18,0
		0,02	120	1000	21 49 65	45,0	9,2
		0,04	30	500	82 86 107	91,7	37,4
		0,04	60	1000	40 42 47	43,0	8,8

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 180		0,04	120	1000	1 2 5	2,7	0,6
Hy 182	79,7	-	-	200	157 159 162	159,4	-
		0,00	60	200	114 143 146	134,4	100,0
		0,03	30	500	123 132 152	135,7	40,4
		0,03	60	1000	102 112 130	114,7	17,1
		0,04	30	500	94 115 117	108,7	32,4
		0,04	60	1000	57 75 95	75,7	11,3

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 182		0,04	120	500	76 51	63,5	1,9
Hy 184	130,1	-	-	200	246 252 284	260,1	-
		0,00	60	200	186 218 233	212,3	100,0
		0,02	30	500	392 412 415	406,3	76,5
		0,02	60	500	339 381 403	374,3	70,5
Hy 186	105,8	-	-	200	204 206 225	211,7	-
		0,00	60	200	160 172 197	176,3	100,0

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 186		0,02	30	500	366 380 402	382,7	86,8
		0,02	60	500	304 345 348	332,3	75,4
		0,02	120	1000	292 340 353	328,3	37,2
		0,04	30	500	267 308 338	304,3	69,0
		0,04	60	1000	182 304 361	282,3	32,0
Hy 121	54,0	-	-	200	102 109 113	108,0	-
		0,00	60	200	56 67 86	69,7	100,0

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 121		0,02	30	200	37 48 60	48,3	69,3
		0,02	60	500	60 116 141	105,7	60,6
		0,02	90	500	58 79 114	83,7	48,0
		0,02	120	500	58 70 91	73,0	41,9
		0,03	30	200	27 47 56	43,3	62,2
		0,03	60	500	70 75 77	74,0	42,5
		0,03	90	500	32 32 39	34,3	19,7

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 121		0,03	120	1000	80 103 148	110,3	31,7
		0,04	30	500	43 62 91	65,3	37,5
		0,04	60	500	14 22 35	23,7	13,6
		0,04	90	1000	14 24 48	28,7	8,2
		0,05	30	500	28 30 35	31,0	17,8
		0,05	60	1000	10 14 18	14,0	4,0
		0,05	90	1000	16 21 32	23,0	6,6

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 123	48	-	-	200	83 96 109	96,0	-
		0,00	60	200	79 81 83	81,0	100,0
		0,02	30	200	16 22 49	29,0	35,8
		0,02	60	500	89 92 95	92,0	45,4
		0,02	90	500	84 94 112	96,7	47,7
		0,02	120	500	49 70 97	72,0	35,6
		0,03	30	200	28 36 48	37,3	46,1

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 123		0,03	60	500	39 56 73	56,0	27,7
		0,03	90	500	19 38 67	41,3	20,4
		0,03	120	1000	87 101 126	104,7	25,8
		0,04	30	500	38 51 60	49,7	24,5
		0,04	60	500	26 34 43	34,3	17,0
		0,04	90	1000	41	41,0	10,1
		0,05	30	500	18 29 40	29,0	14,3
		0,05	60	1000	35 37	36,0	8,9

Passage-Nr. der Zell-linie	PE[1]	C_{FU}[2]	t[3]	Zellein-saat	Zahl der Kolonien pro Flasche	n[4]	Ü.R.[5]
Hy 123		0,05	90	1000	15 25	20,0	4,9

(1) PE: Überlebensrate unbehandelter Zellen in %

(2) Fluoruracilkonzentration in mg/ml. $C_{FU} = 0$ stellt den Kontrollwert dar: anstelle von in Hank's gelöstem FU wird nur Hank's zugesetzt. Behandlung ansonsten gleich

(3) Einwirkdauer des FU auf die Zellen in Minuten

(4) Mittelwert der Zahl der Kolonien

(5) Überlebensrate der behandelten Zellen in %. Dieser Wert berechnet sich wie folgt:

$$\left(\frac{n}{\text{Zelleinsaat}} : \frac{n \text{ der ohne FU behandelten Kontrollen}}{\text{Zelleinsaat der Kontrollen}} \right) \times 100$$

Tabelle 3: Zuordnung der Ü.R. bei verschiedenen t aus den Tabellen 2 zu den C_{FU} 0,02 mg/ml bis 0,05 mg/ml. Darstellung der Mittelwerte der Ü.R. sowie ihrer Standardabweichungen für Mittelwertsberechnungen aus mehr als zwei Werten.

Passage-Nr. der Zell-linie	Kontroll-PE[1]	C_{FU}	Ü.R. bei 30'	60'	90'	120'
Hy 178	77,0	0,02	74,1	48,0	-	-
Hy 180	49,0		42,3	18,0	-	9,2
Hy 184	106,2		76,5	70,5	-	-
Hy 186	88,2		86,8	75,4	-	37,2
Hy 121	34,9		69,3	60,6	48,0	41,9
Hy 123	40,5		35,8	45,4	47,7	35,6
	Mittelwert der Ü.R.:		64,1	53,0	47,9	31,0
	Standardabweichung:		18,6	19,0	-	12,8

Passage-Nr. der Zell-linie	Kontroll-PE [1]	C_{FU}	Ü.R. bei 30'	60'	90'	120'
Hy 178	77,0	0,03	40,9	-	-	-
Hy 182	67,2		40,4	17,1	-	-
Hy 121	34,9		62,2	42,5	19,7	31,7
Hy 123	40,5		46,1	27,7	20,4	25,8
	Mittelwert der Ü.R.:		47,4	29,1	20,1	28,8
	Standardabweichung:		8,8	10,4	-	-
Hy 180	49,0	0,04	37,4	8,8	-	0,6
Hy 182	67,2		32,4	11,3	-	1,9
Hy 186	88,2		69,0	32,0 [2]	-	-
Hy 121	34,9		37,5	13,6	8,2	-
Hy 123	40,5		24,5	17,0	10,1	-
	Mittelwert der Ü.R.:		40,2	15,7	9,2	1,3
	Standardabweichung:		15,2	6,6	-	-

Passage-Nr. der Zell-linie	Kontroll-PE[1]	C_{FU}	Ü.R. bei 30'	60'	90'	120'
Hy 121	34,9	0,05	17,8	4,0	6,6	-
Hy 123	40,5		14,3	8,9	4,9	-
		Mittelwert der Ü.R.:	16,1	6,5	5,8	

(1) $\text{Kontroll-PE} = \frac{\text{n der ohne FU behandelten Kontrollen}}{\text{Zelleinsaat der Kontrollen}} \times 100$

(2) Dieser Wert errechnet sich aus drei Koloniezahlen pro Flasche, von denen eine 200 % einer anderen beträgt. Der Verdacht auf einen systematischen Fehler (doppelte Zelleinsaat) liegt nahe. Daher geht in obige Mittelwertsberechnung der Ü.R.-Wert ein, der unter Auslassung des 200 % Zählwertes ermittelt wurde. (27,6)

Tabelle 4: Zuordnung der mittleren Ü.R. aus Tabelle 3 bei verschiedenen C_{FU} zu t 30 min bis 90 min.

t	Ü.R. bei 0,02	0,03	0,04	0,05 mg FU/ml
30	64,1	47,4	40,2	16,1
60	53,0	29,1	15,7	6,5
90	47,9	20,1	9,2	5,8

Tabelle 5: Zur Erzielung bestimmter Überlebensraten (0,5; 0,2; 0,1) benötigte Expositionszeiten für unterschiedliche C_{FU} (0,02 mg/ml - 0,05 mg/ml). Die Ü.R. wurden an den korrigierten Kurven abgelesen.

Ü.R.	0,02	0,03	0,04	0,05 mg FU/ml
0,5	75	37,5	24,5	16,5 (min)
0,2	175	90	56	39,5 (min)
0,1		139	82,5	57

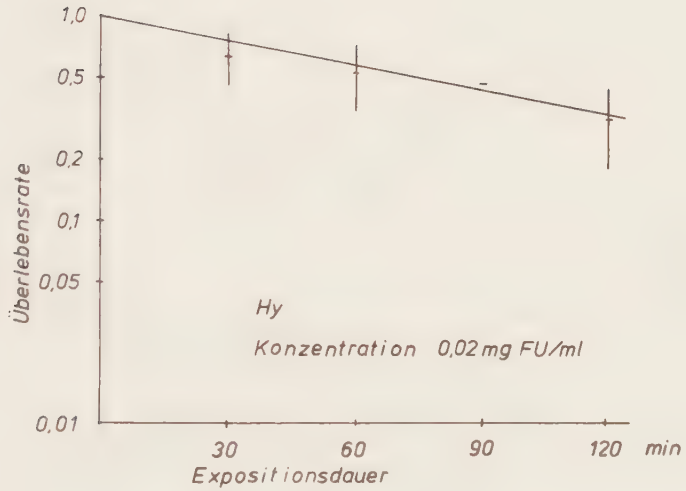

Abb. 2: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei einer Konzentration von 0,02 mg FU/ml.

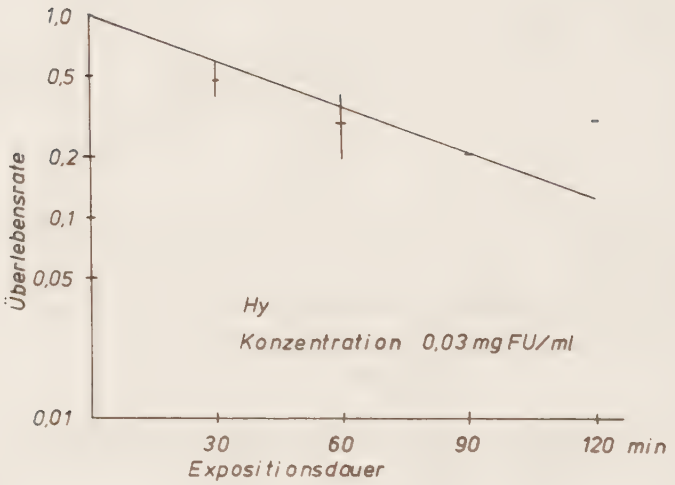

Abb. 3: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei einer Konzentration von 0,03 mg FU/ml.

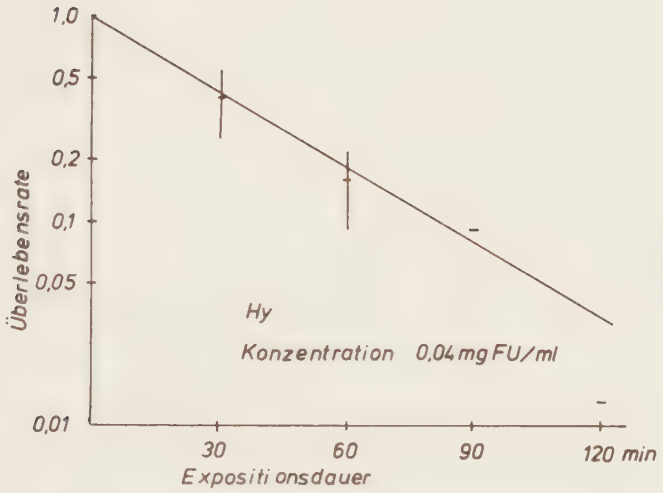

Abb. 4: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei einer Konzentration von 0,04 mg FU/ml.

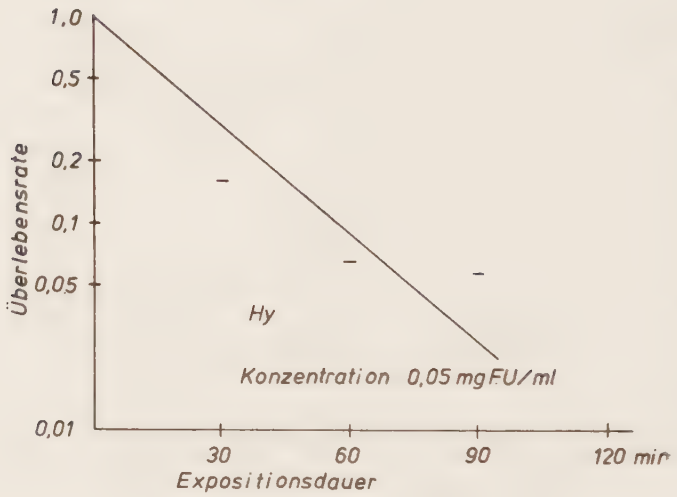

Abb. 5: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei einer Konzentration von 0,05 mg FU/ml.

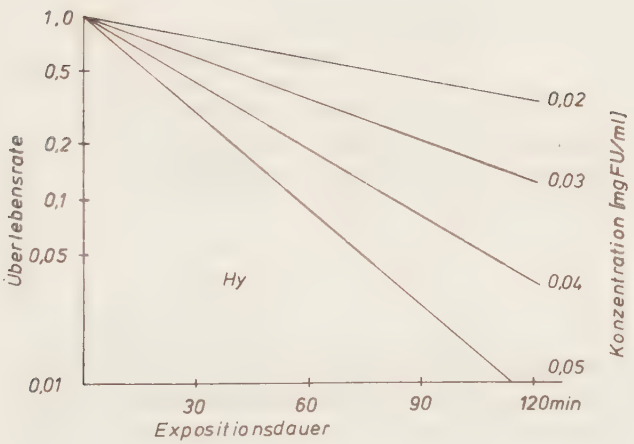

Abb. 6: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer bei FU-Konzentrationen von 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml und 0,05 mg/ml.

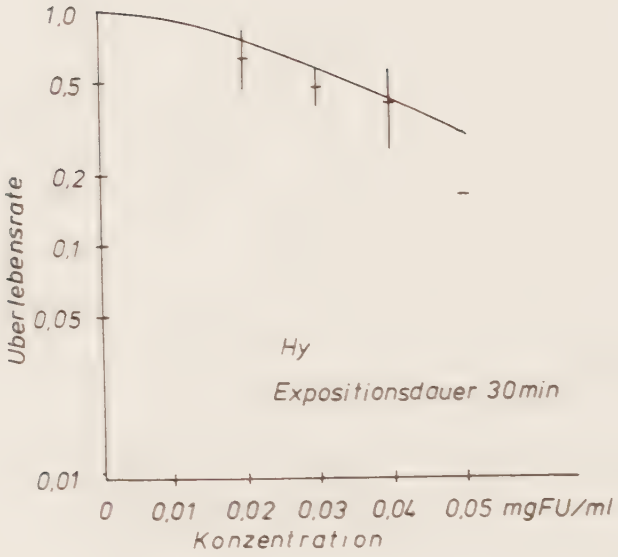

Abb. 7: Oberlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Konzentration bei einer Expositionsdauer von 30 min. D_o = 0,032 mg/ml; D_q = 0,0115 mg/ml.

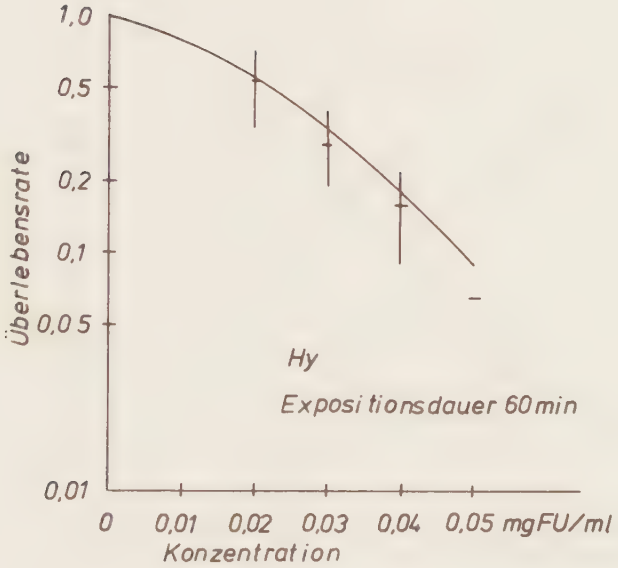

Abb. 8: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Konzentration bei einer Expositionsdauer von 60 min. D_o = 0,0145 mg/ml; D_q = 0,016 mg/ml.

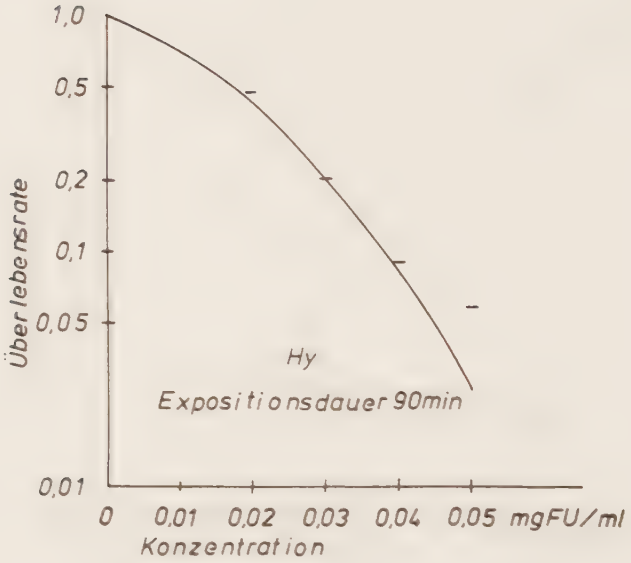

Abb. 9: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit von der Konzentration bei einer Expositionsdauer von 90 min. D_o = 0,0085 mg/ml; D_q = 0,0185 mg/ml.

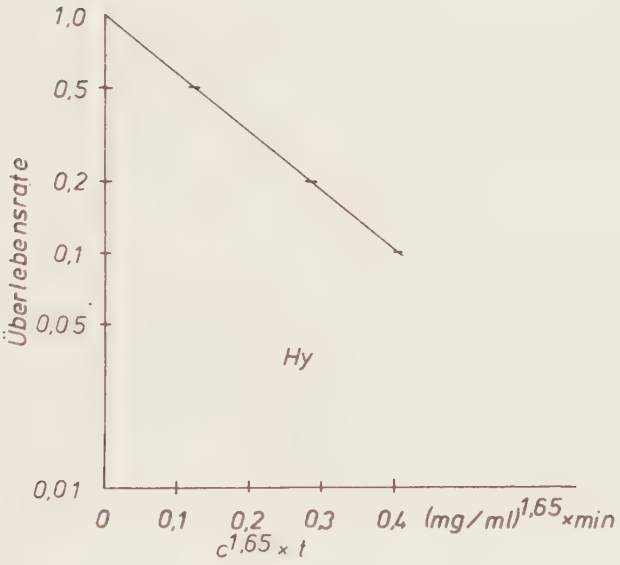

Abb. 10: Überlebensrate von Chinesischen Hamsterzellen in Abhängigkeit vom Produkt aus Konzentration ^{1,65} und Expositionsdauer. a = 5,5.

4. Diskussion

4.1. Vorwort

Im Folgenden soll versucht werden, einen Teil der bisherigen Erkenntnisse über 5-Fluoruracil und seine Wirkungsweise kurz zusammenzufassen, nicht weil dies zum Verständnis der Ergebnisse der hier geschilderten Versuche unbedingt erforderlich wäre, sondern weil dadurch die Komplexität der Wirkungen dieses Zytostatikums auf die biologische Einheit Zelle verdeutlicht werden soll, eine Komplexität, die letztlich die stark schwankenden, oft paradoxen Effekte auf biologische Systeme erklärt, mit denen ich auch bei meinen Versuchen konfrontiert wurde. Fast alle hier genannten Fakten sind dem Kapitel "Fluorinated Pyrimidines and Their Nucleosides" aus dem Buch "Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, Part 2" (Heidelberger, 1975) entnommen.

4.2. Entdeckung

Da FU eine seltene Ausnahme in der Vielzahl synthetisch hergestellter, pharmakologisch wirksamer Substanzen darstellt, deren gezielte Nutzbarkeit als Medikament oft nur zufällig im Rahmen groß angelegter Versuchsreihen entdeckt wird, sei hier kurz auf seine Geschichte eingegangen.

Das Zytostatikum FU wurde regelrecht als solches konzipiert und besitzt alle Eigenschaften, welche ihm seine Konstrukteure im vorhinein voraussagten.

Rutmann und Mitarbeiter (1954) beobachteten, daß der Ribonucleinsäurebaustein Uracil von einem chemisch in-

duzierten Hepatom der Rattenleber zur Synthese von Nucleinsäurepyrimidinen herangezogen wurde. Normale Rattenleber besitzt diese Eigenschaft nicht. Heidelberger et al. (1957) bestätigten dieses Ergebnis mit Versuchen an anderen Tumoren, welche alle bevorzugt Uracil anstelle des Hauptvorläufers der Pyrimidine in normalen Geweben, der Orotsäure, verbrauchten. Die gleich den malignen Tumoren schnell proliferierende Darmschleimhaut zeigte ähnliche Eigenschaften.

Es war nun naheliegend, diese Selektivität für die Chemotherapie von Tumoren zu nutzen. Um sie in vollem Umfang zu erhalten, galt es, das Uracilmolekül so wenig wie möglich zu verändern. Eine Änderung war jedoch nötig, um der Base zytotoxische und damit tumorhemmende Eigenschaften zu verleihen. Da man wußte, daß Liebecq und Peters (1949) durch Substitution eines Fluoratoms das Azetat um ein Vielfaches toxischer gemacht hatten, ersetze man das H-Atom in 5-Stellung am Uracil durch ein Fluoratom.

In 6-Stellung fluorsubstituiertes Uracil erwies sich als unstabil. (Wempen and Fox, 1964 a)

4.3. Synthese

Die Synthese gelang aus azyklischen Vorstufen (Duschinsky et al., 1957) und wird in Abbildung 1 aufgezeigt.

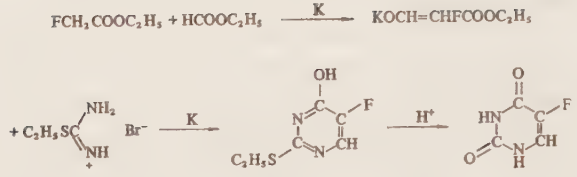

Abb. 1: Synthese des 5-Fluoruracil (Duschinsky et al., 1957).

Der selbe Syntheseweg wird heute noch bei der kommerziellen FU-Produktion beschritten, obwohl in neuerer Zeit auch die direkte Fluorierung des Uracils möglich wurde. (Robins and Naik, 1971)

4.4. Physikalische und chemische Eigenschaften

Die so entstandene neue Verbindung 5-FU hat annähernd dieselben physikalischen und chemischen Eigenschaften wie Uracil.

Im Gegensatz zu diesem besitzt es jedoch eine größere Löslichkeit und mit einem pK_a von 8,15 gegenüber 9,45 mehr saure Eigenschaften. Das resultiert aus der Stabilität der C-F Bindung und dem induktiven Effekt, der von ihr ausgeht und ist hinsichtlich der zytotoxischen Funktion von entscheidender Bedeutung.

Bei UV-Bestrahlung zerfällt FU in das säurestabile, jedoch in basischem Milieu nicht beständige 5-fluor-5-hy-

droxy-5, 6-dihydrouracil (Lozeron et al., 1964). Dies erklärt die Tatsache, daß das Tabakmosaikvirus, welches FU in seine RNA einbaut, durch FU photosensibilisiert wird (Lozeron and Gordon, 1964).

4.5. Metabolismus und Tumorselektivität des FU

Der Metabolismus des FU unterscheidet sich nicht von dem des Uracils.

Mukherjee und Heidelberger (1960) fanden heraus, daß FU in allen normalen Geweben der Maus, einschließlich derer mit hoher Proliferationsrate, zu α -Fluor-β -alanin, CO_2 und Ammoniak abgebaut wird. In experimentellen Maustumoren, aber auch in menschlichen Tumoren fand dieser Abbau nicht statt (Mukherjee and Heidelberger, 1960. Mukherjee et al., 1963 b). Dies veranlaßte Heidelberger (1965) zu der Annahme, daß dadurch die Tumorselektivität des FU bedingt wäre.

Ein weiterer möglicher Mechanismus für eine Tumorselektivität des FU besteht darin, daß ein Enzym, welches unter Umgehung des 5-Fluoruridin die direkte Umwandlung von FU in sein Monophosphat katalysiert, in Tumoren in größerem Ausmaß als in der Leber vorhanden ist und kaum mit Uracil selbst reagiert (Reyes, 1969).

Der Aufbau der Ribonukleotide des FU vollzieht sich bis hin zu den Triphosphaten. Diese werden in die RNA eingebaut. Ein Einbau von FU-Nukleotiden in die DNA findet nicht statt, da nur das Desoxyribonukleotidmonophosphat nicht aber Di- und Triphosphate des FU gebildet werden. Jedenfalls konnten Bosch et al. (1958) keine Di- und

Triphosphate des FU in FU-exponierten Ehrlich-Aszitestzellen nachweisen. Dem Desoxyribonucleotidmonophosphat des FU kommt jedoch nach bisher gültiger Meinung die entscheidende Bedeutung bei der Hemmung des Zellwachstums zu.

4.6. Beeinflussung der DNA-Synthese durch 5-FU

Auch aufgrund der geringen Größe des Fluoratoms, bedingt durch die Van der Waal'schen Radien und Strukturen, werden die ohnehin nicht nachweisbaren Triphosphatnucleotide des FU nicht in die DNA eingebaut. Trotzdem ist nach bisher gültiger Meinung der Einfluß des FU auf die DNA der primäre Tumorhemmechanismus dieses Zytostatikums. Eine größere Bedeutung der anderen im folgenden aufgeführten Wirkungen des FU müßte jedenfalls noch nachgewiesen werden.

Bei der DNA-Synthese wird kein Uracil, vielmehr dessen Methylisationsprodukt Thymin verwertet. Der essentielle DNA-Baustein Thymidilat wird dabei durch Methylierung von Desoxyuridylat in 5-Position synthetisiert. Bei dieser Reaktion fungieren die Thymidylatsynthetase als Enzym, Methylentetrahydrofolsäure als Coenzym und Formiat als Vorstufe der Methylgruppe. Letzteres wurde ^{14}C markiert an FU-behandelte Mäuse verabreicht und fand sich nur in deutlich gegenüber der Norm verringertem Ausmaß in der DNA der Gewebe, am deutlichsten verringert aber in der DNA transplantierter Tumoren wieder. Der Formiateinbau in die Purine von DNA und RNA war jedoch normal. Dies zeigt nicht nur deutlich, daß FU keineswegs ein Folsäureantagonist ist, sondern, daß es

spezifisch die Methylisationsreaktion, welche zu Thymidylat führt, blockiert (Danneberg et al., 1958).

Das Enzym Thymidylatsynthetase wird dabei durch 5-Fluor-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (= FdUMP) kompetetiv gehemmt. FdUMP wird aufgrund seines gesteigerten Säurecharakters stärker an das Enzym gebunden als der normale Metabolit und fungiert so als starker kompetitiver Antagonist, wie in Enzymkinetikstudien an Ehrlich Aszitestellen nachgewiesen wurde (Hartmann and Heidelberger, 1961).

Der auf diese Weise entstehende Thyminmangel behindert die DNA-Synthese, was sich bereits an Hela-Zellen (Rueckert and Mueller, 1960) und vielen anderen Zellen und Organismen einschließlich menschlicher Tumoren zeigen ließ (Wolberg 1969).

E. coli Bakterien erlagen dem Thyminmangeltod, welcher durch ein ständiges Ansteigen des Gehalts an RNA und Protein bei gleichbleibendem DNA-Gehalt charakterisiert ist (Cohen et al. 1958).

Die von vielen angenommene alleinige Bedeutung des eben geschilderten Hemmechanismus für die zytostatische Wirksamkeit des FU wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß sich ein Ehrlich-Aszitestumor mit veränderter durch FdUMP nicht antagonisierbarer Thymidylatsynthetase gegen FU 1000 x resistenter erwies als ein Vergleichstumor (Heidelberger et al., 1960 a).

4.7. FU-Einfluß auf die RNA-Synthese

Die vorrangige Bedeutung der DNA-Synthesehemmung durch FU wird ebenfalls durch Studien von Danneberg et al. (1958) sowie von Bosch et al. (1958) aufgezeigt, in welchen nachgewiesen wird, daß FU die DNA-Synthese weit mehr hemmt als die RNA-Synthese. Letzterer stellte fest, daß FU nur in hoher Dosierung und nur teilweise den Uracileinbau in Ehrlich-Aszitestellen verhindert.

4.8. FU-Einfluß auf die Ribosomensynthese

Sowohl in vivo als auch in vitro wurde beobachtet, daß in Gegenwart von FU abnormale Partikel synthetisiert wurden. Diese FU-Partikel hatten veränderte Sedimentationseigenschaften und waren weniger stabil als Ribosomen, die in Abwesenheit von FU synthetisiert wurden. Sie dienten nicht als Vorläufer normaler Ribosomen, sondern mußten erst abgebaut werden, um für deren Synthese Verwertung zu finden. Auch die RNA dieser Partikel wies veränderte Sedimentationseigenschaften und eine niedrigere Halbwertszeit auf (Andoh and Chargaff, 1965). In Hefezellen zeigte sie eine für r-RNA abnorme, der DNA ähnliche Basenzusammensetzung (De Kloet, 1968). Die Proteine der FU-Partikel fanden in normalen Ribosomen keine Verwertung (Iwabuchi et al., 1966). In Anwesenheit von Aktinomycin D wurden keine FU-Partikel in normale Ribosomen umgewandelt (Hills and Horowitz, 1966). Vor allem letzteres läßt den Schluß zu, daß die unter Einwirkung von FU gebildeten ribosomalen Partikel keine normalen Zwischenprodukte der Ribosomensynthese sind.

4.9. FU-Einbau in die RNA

Aufgrund der Kleinheit des Fluoratoms wird FU selektiv in die RNA eingebaut. Bei FU-exponierten E. coli Bakterien wurde bis zu 50 % FU anstelle von Uracil in die Gesamt-RNA eingebaut (Harbers et al., 1959).

Wie auch bei anderen Experimenten ergab sich kein Hinweis darauf, daß Fu zu Fluorcytidin umgebaut worden wäre. Auch fand keine Defluorierung statt (Chaudhuri et al., 1958).

FU wurde schneller in die Kern- als in die Zytoplasma-RNA eingebaut (Harbers et al., 1959).

4.10. FU-Einfluß auf den RNA-Code

Aufgrund seines gegenüber Uracil vermehrten Säurecharakters besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß FU unkorrekterweise mit Guanin Basenpaarung eingeht, wodurch es sowohl auf der Ebene der Transkription, als auch auf der Ebene der Translation zu Kodierungsfehlern kommen könnte.

In einem zellfreien System wurden jedoch keine Transkriptionsfehler entdeckt (Bujard and Heidelberger, 1966). Fehler auf der Ebene der Translation konnten vor allem von Rosen (1969) nachgewiesen werden, gelten jedoch als ausgesprochen seltene Ereignisse. FU-behandelte RNA-Viren zeigten denn auch keine Abnormitäten ihres Mantelproteins (Houlabek, 1962).

4.11. FU und Zellzyklus

Madoc-Jones und Bruce (1968) wiesen nach, daß FU in weit größerem Maße auf logarithmisch wachsende Mäuseleukämiezellen tödlich wirkt als auf stationäre. Es wirkt also auf Zellen, die sich im Zellzyklus befinden und kann deshalb als zyklusspezifisches Zytostatikum bezeichnet werden. Seine Toxizität erstreckt sich selektiv auf alle schnell proliferierenden Gewebe, ganz gleich ob diese gut- oder bösartig sind (Bruce and Meeker, 1967).

Seine wachstumshemmende Wirkung auf Zellkulturen kann durch Thymidinzugabe rückgängig gemacht werden (cf. Umeda and Heidelberger, 1968), da sie ja, wie angenommen wird, auf der kompetitiven Hemmung der Thymidylatsynthetase beruht. Gleichzeitige Zugabe von FU und Thymidin verhindert den Zelltod. Wird jedoch Thymidin erst 40 Stunden nach FU-Zugabe beigemengt, ist dessen tödlicher Effekt nicht mehr reversibel. Madoc-Jones and Bruce (1968) führen dies auf die Effekte des FU-Einbaus in die RNA zurück. Eine Alternative zu dieser Behauptung ist die Annahme, daß das nach 40 Stunden eingetretene Ungleichgewicht von fortlaufender RNA- und Proteinsynthese zu geblockter DNA-Synthese den irreversibelen Thyminmangeltod hervorruft (cf. Cohen et al., 1958).

4.12. Klinische Anwendung

FU wird häufig bei der Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium angewandt. Speziell bei Brustkrebs sowie bei gynäkologischen und

gastrointestinalen Tumoren bewirkt es eine objektivierbare Tumorregression. Gegen Leukämien und Lymphome scheint es nicht wirksam zu sein (Heidelberger, 1975).

Die hauptsächlichen toxischen Nebenwirkungen sind: Leukopenie, Stomatitis, Diarrhoe, Nausea und Erbrechen.

Es wurden bereits mehrere klinische Studien mit verschiedenen Dosierungsrichtlinien durchgeführt. Obwohl FU nun schon seit 15 Jahren in der Klinik zur Anwendung gebracht wird, herrscht noch immer Uneinigkeit über die Art der Verabreichung und Dosierung. Ursprünglich wurde FU monatlich an jeweils 5 bis 7 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (Heidelberger, 1975). Heute scheint es, daß eine Dosis pro Woche genauso wirksam ist und weniger Toxizität und Unwohlsein mit sich bringt. Eine wöchentliche Einzeldosis FU verursachte weniger toxische Erscheinungen als multiple Dosen bei offensichtlich gleichem therapeutischem Effekt (Jakobs et al., 1971).

Oral verabreichtes FU bewährte sich bei der Behandlung von Kolon-Rektumkarzinomen einschließlich ihrer Lebermetastasen (Lahiri et al., 1971). Die orale Verabreichung ist in diesen Fällen hinsichtlich der Effizienz der intravenösen Verabfolgung überlegen und hat weniger hämatologische, dafür aber mehr gastrointestinale Nebenwirkungen (Bateman et al., 1971).

Die kontinuierliche intraarterielle FU-Infusion in die Arteria hepatica bei Patienten mit Lebermetastasen ist aufgrund der stärkeren Tumorregression und der minimalen Systemtoxizität der konventionellen intravenösen FU-Therapie vorzuziehen (Ansfield et al., 1971 b).

FU in lokal wirksamer Zubereitung wurde erfolgreich bei der Behandlung der prämalignen aktinischen Keratose sowie des oberflächlichen Basalzell- und Plattenepithel-Karzinoms der Haut eingesetzt. Von einer lokalen Behandlung invasiver Basalzellkarzinome wird jedoch abgeraten (Williams and Klein, 1970).

Die Kombination von FU mit anderen Zytostatika wird in großem Umfang durchgeführt. Es ist evident, daß FU, kombiniert mit Vincristin, Methotrexat, Cyclophosphamid und Prednisolonderivaten therapeutisch wirksamer gegen Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium ist, als jede dieser Substanzen für sich allein (Ansfield et al., 1971 a).

Die Kombination von FU mit Röntgenbestrahlung steigerte die Überlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittenem Tonsillen- und Mundbodenkrebs gegenüber der ausschließlich bestrahlten Vergleichsgruppe (Ansfield et al., 1970). Cohen et al. (1971) beobachteten einen additiven Effekt von FU und Röntgenbestrahlung bei inoperabelen Bronchialkarzinomen.

4.13. Klinische Pharmakologie

Versuche mit FU-2-C^{14} wurden an Krebspatienten durchgeführt. Nach i.v.-Injektion betrug die Halbwertszeit der totalen Plasmaradioaktivität ungefähr eine Stunde. Nach Injektion wurde schnell radioaktives CO_2 über die Lungen ausgeschieden. Nach oraler Applikation wurden 90 %, nach intravenöser etwa 70 % der Radioaktivität innerhalb der ersten 12 Stunden in Form von radioaktivem CO_2 ausgeschieden. Es wird also keine nennenswerte Menge

über längere Zeit hin in den Geweben gebunden. Bis zu 10 % der zugeführten Aktivität fand sich als radioaktive Harnsäure im Urin wieder. Nach intravenöser Verabreichung wurde etwas radioaktives FU im Liquor entdeckt (Mukherjee et al., 1963 a).

In extirpierten Kolonkarzinomen fanden sich vergleichsweise mehr unverändertes FU bzw. FU-Nukleotide als in der umgebenden gesunden Darmmukosa, die vergleichsweise mehr FU-Abbauprodukte enthielt (Mukherjee et al., 1963 b).

Mittels der Wachstumsbehinderung von Streptokokkus fäcalis-Kulturen durch Patientenserum wurde eine Plasmahalbwertszeit von FU nach i.v.-Injektion von ca. 15 min berechnet; orale Verabreichung führte zu niedrigeren, aber länger anhaltenden Blutspiegelwerten (Clarkson et al., 1964). Gleichmäßige Wirkspiegel über längere Zeit hin lassen sich nur durch kontinuierliche Infusion erreichen.

Der von Jakobs et al. (1971) praktizierte Verabreichungsmodus (1 x wöchentlich i.v.-Injektion) führt, betrachtet man die kurze Plasmahalbwertszeit, nur zu einer kurzen Pulsexposition der Krebszellen in vivo. Allerdings können je nach Menge der verabreichten Dosis hohe peak-Konzentrationen erreicht werden.

Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse meiner Versuche am in vitro-Modell geben einen Hinweis darauf, daß die peak-Konzentration des Cytostatikums FU jedenfalls in vitro wesentlich bedeutsamer für seinen Effekt ist, als seine Einwirkdauer.

4.14. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei konstanter Konzentration nahm die Überlebensrate mit zunehmender Expositionszeit exponentiell ab. Bei konstanter Expositionszeit nahm die Überlebensrate mit zunehmender Konzentration in Form einer Schulterkurve ab.

4.15. Fehlermöglichkeiten

Obwohl ich alle dieser Arbeit zugrundegelegten Versuche mit größtmöglicher Genauigkeit nach demselben Schema und unter den selben Bedingungen durchführte, weisen die Ergebnisse der einzelnen Versuche für ein und denselben Punkt oft Unterschiede auf, deren Ausmaß an der Höhe der Standardabweichungen zu ermessen ist. Jeder der sieben Versuche ist, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, durch einen eigenen PE-Wert (Überlebensrate unbehandelter Zellen in Prozent) charakterisiert. Der höchste PE-Wert beträgt 130,1 %, der niedrigste 48 %. PE-Wertschwankungen diesen Ausmaßes kommen bei Versuchen mit Zellkulturen üblicherweise vor. Ein Zusammenhang zwischen Höhe des PE-Wertes und Höhe der Überlebensraten behandelter Zellen scheint jedoch nicht zu bestehen. So sind die Ergebnisse von Hy 184 (PE = 130,1 %) und Hy 121 (PE = 54 %) für 0,02 mg FU/ml 30 bzw. 60 min einander ähnlicher als die Ergebnisse von Hy 178 (PE = 100,3 %) und Hy 186 (PE = 105,8 %) für die selben Punkte.

Bei der Untersuchung der Wirkung chemischer Substanzen auf Zellen liegt es nahe, Unterschiede der Wirksamkeit

in Unterschieden der Mediumzusammensetzung, vor allem des Serumanteils zu vermuten. Alle Experimente wurden jedoch mit dem gleichen standartisierten Medium und der gleichen Charge Kalbserum durchgeführt, so daß solche Faktoren weniger wahrscheinlich sind.

Alle Versuche wurden mit der gleichen Packung FU (Verfallsdatum April 1978) durchgeführt, eine angebrochene Ampulle wurde nur für einen Versuch verwendet.

Vielmehr liegt es nahe, die nicht optimale Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse in Schwankungen des biologischen Verhaltens der Zellen zu suchen, vor allem gerade in proliferationskinetischen Unterschieden. FU ist ein in hohem Maße proliferationsspezifisches Zytostatikum mit stark bevorzugter Wirkung auf logarithmisch wachsende Zellen (Madoc-Jones and Bruce, 1968). Eine Teilsynchronisation durch die Trypsinbehandlung beim Passagieren der Zellen, die sich über bis zu 10 Stunden erstreckt, wurde von Berry, Evans und Robinson (1966) beschrieben. Die unterschiedliche zytostatische Wirkung von FU bei den verschiedenen Versuchen könnte unter anderem dadurch erklärt werden.

Bei den Konzentrationen 0,03 sowie 0,05 mg FU/ml ist ein Ansteigen der Überlebensraten nach langer Expositionsdauer auffallend, die ich allerdings bei der Kurvenlegung nicht berücksichtigte. Es ist nicht auszuschließen, daß dieser Effekt durch eine thyminbedingte Hemmung der FU-Wirkung (cf. Umeda and Heidelberger 1968) zustande kam, wenn man voraussetzt, daß nach längeren Expositionszeiten bereits Zellen in Lysis übergingen und Thymin freisetzten.

4.16. Das Produkt aus Konzentration und Expositionszeit

Obwohl die oben genannte Streuung der Überlebensraten die Eindeutigkeit des Ergebnisses schmälert, schien die Annahme einer exponentiellen Konzentration-Effekt-Beziehung und einer schulterförmig verlaufenden Zeit-Effekt-Kurve gerechtfertigt.

Druckrey und Küpfmüller (1949) verfaßten eine umfangreiche Abhandlung über pharmakologische Dosis-Effekt-Beziehungen.

Darin unterscheiden sie im wesentlichen drei Typen von Giften mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus.

Die Konzentrationsgifte stellen den einfachsten Fall dar. Ihre Wirkung ist schnell reversibel, so daß deren Stärke der jeweils herrschenden Giftkonzentration am Rezeptor entspricht.

Ist dagegen die Reversibilität der Bindung des Giftes an die spezifischen Rezeptoren gering, so ist auch der zeitliche Ablauf der Rezeptorenbesetzung verzögert. Aus diesem Grund wird bei derartigen Giften eine ausgesprochene Latenzzeit in Erscheinung treten müssen. Eine quantitative Beziehung zwischen der Wirkungsstärke und der im gleichen Augenblick am Wirkungsort vorhandenen Giftkonzentration besteht hier nicht mehr. Vielmehr ist es für diesen Fall gerade charakteristisch, daß die Wirkung nachhinkt und auch länger fortbesteht als überhaupt noch freies Gift am Wirkungsort vorhanden ist. Bei zu schneller Wiederholung der Giftzufuhr muß deshalb eine Kumulation auftreten. Es sind die kumulierenden Gifte.

Im Extremfall ist die Wirkung bzw. die Rezeptorenbesetzung praktisch irreversibel. Dies hat zur Folge, daß die Wirkung fortgesetzt weiterwächst, solange überhaupt noch Giftstoff vorhanden ist. Die Zunahme der Wirkung in einem Zeitintervall $(\frac{d}{d}\frac{W}{t})$ ist um so größer, je höher im gleichen Zeitpunkt die Giftkonzentration C ist.

Es ist also dieser Gifttyp grob gekennzeichnet durch die Beziehung:

$$\frac{d\,W}{d\,t} \sim C$$

Die im Zeitpunkt t aufgelaufene Wirkung hängt daher vom Integral der Giftkonzentration über die Zeit ab. Im einfachsten Falle, wenn die Giftkonzentration konstant ist, ist die Wirkung durch das Produkt aus Konzentration und Zeit der Einwirkung gegeben. Für einen bestimmten Wert von W, also für eine bestimmte Quantität der Wirkung gilt:

$$Ct = \text{konstant.}$$

Daher heißen diese Gifte Ct-Gifte oder besser Summationsgifte. Bei ihnen ist also nicht einfach die Höhe der Giftkonzentration C allein entscheidend für den Effekt, wie dies bei den Konzentrationsgiften in erster Näherung der Fall ist, sondern ebenso die Zeitdauer, über die sich die Einwirkung erstreckt. Die Besonderheit der Ct-Gifte ist überall dort in Betracht zu ziehen, wo irreversible Effekte auftreten bzw. angestrebt werden. Hierher gehört auch die letale Wirkung, also Abtötung von Krankheitserregern und Krebszellen durch Desinfektionsmittel und Chemotherapeutika.

Druckrey und Küpfmüller postulierten für alle cytotoxisch wirkenden Pharmaka folgende Grundgleichung:

$$(C - C_s)^n \times (t - t_s) = \text{konstant}$$

Dabei ist C die wirksame intrazelluläre Konzentration, C_s die angenommene Konzentration bei unendlich langer Expositionsdauer, t die tatsächliche Expositionszeit und t_s die angenommene minimale Expositionszeit für unendlich hohe Giftkonzentrationen. Der Exponent n kann dabei kleiner oder größer als 1 sein, ohne daß dadurch ein Zusammenhang zum vorliegenden Wirkmechanismus gegeben ist. Aufgrund experimenteller Erkenntnisse über karzinogene Substanzen schlagen die Autoren für die praktische Anwendung die schon oben abgeleitete vereinfachte Form der Gleichung vor:

$$Ct = \text{konstant}.$$

Wellet (1975) übernahm diese vereinfachte Gleichung für seine Abhandlung "The Constancy of the Product of Concentration and Time".

Skipper (1965) überprüfte sie anhand der Wirkung von NSC 409962, einer nicht in den Handel gelangten Substanz, auf E. coli Bakterien und fand:

$$C^{2/3} \cdot t = \text{konstant}.$$

Aus Tabelle 5 dieser Arbeit sind die anhand von Abbildung 9 ermittelten Expositionszeiten ersichtlich, welche nötig sind, um bei den verschiedenen Konzentrationen einen bestimmten zytotoxischen Effekt, das heißt eine bestimmte Abnahme der Überlebensraten zu bewirken.

Auch hier bildet das Produkt aus Konzentration (mit einem von 1 verschiedenen Exponenten) und Expositionsdauer eine Konstante.

Folgende Gleichung wurde ermittelt:

$$C^{1,65} \cdot t = \text{konstant.}$$

Trott und Bölükbasi (1976) fanden für die Wirkung von Thio-TEPA auf Chinesische Hamsterzellen denselben Zusammenhang, allerdings mit kleinerem Exponenten:

$$C^{1,2} \cdot t = \text{konstant.}$$

Legt man obige von mir ermittelte Gleichung zugrunde, so lassen sich alle in Tabelle 3 und 4 sowie Abbildung 2 bis 9 dargestellten Ergebnisse für die Fraktion S der überlebenden Zellen durch folgende Formel ausdrücken:

$$S = e^{-(a \cdot C^{1,65} \cdot t)}$$

Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 10 graphisch veranschaulicht. Aus der Steigung der Geraden läßt sich die Konstante a ablesen.

$$a = 5{,}5.$$

Gleichungen wie die obige, sind für die Strahlenwirkung seit langem bekannt. Für die Wirkung von Chemotherapeutika, speziell für die Wirkung des Zytostatikums 5-FU, wurden solche Gleichungen bislang noch nicht ermittelt.

Die obige Formel läßt den Schluß zu, daß die Konzentration von 5-FU einen weitaus größeren Effekt hat als seine Einwirkdauer. So benötigt man bei Verminderung

der Konzentration auf die Hälfte eine Verdreifachung der Expositionsdauer, um den selben cytostatischen Effekt zu erzielen.

Sicherlich kann von einem in vitro-Modell nicht auf die Wirkung von FU bei Anwendung am Menschen rückgeschlossen werden. Allerdings zeigen Tierversuche, welche zur Zeit am Strahlenbiologischen Institut der Universität München durchgeführt werden, bereits Ergebnisse, die die Gültigkeit des von mir gefundenen Zusammenhangs bezüglich der Bedeutung der Konzentration für den Effekt von 5-FU auch im in vivo-Modell zu bestätigen scheinen.

Die in dieser Arbeit ermittelte Formel charakterisiert eine pharmakologische Wirkung, die ähnlich der Wirkung von Röntgenstrahlen auf Zellkulturen einer chemischen Gleichung ersten Grades folgt. Nach bisher vorherrschender Meinung beruht der zytostatische Effekt von FU auf einer kompetitiven Hemmung der Thymidilatsynthetase durch den FU-Metaboliten FdUMP. Dies jedoch entspricht einer chemischen Gleichung zweiten Grades und steht somit im Widerspruch zum Ergebnis dieser Arbeit.

5. Zusammenfassung

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten wurde die Abhängigkeit der Überlebensrate von chinesischen Hamsterzellen in vitro von der FU-Konzentration und der Expositionsdauer studiert. Bei konstanter Konzentration nahm die Überlebensrate mit zunehmender Expositionszeit exponentiell ab. Bei konstanter Expositionszeit nahm die Überlebensrate mit zunehmender Konzentration in Form einer Schulterkurve ab. Die Fraktion überlebender Zellen nach FU-Behandlung läßt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$S = e^{-(a \cdot C^{1,65} \cdot t)}$$

S = Fraktion überlebender Zellen
a = 5,5
C = FU-Konzentration
t = Expositionszeit

Aus dieser Formel läßt sich der allgemeine Schluß ziehen, daß die Konzentration des Cytostatikums 5-FU im hier verwandten in-vitro-Modell einen weitaus größeren Effekt hat, als seine Einwirkdauer.

Literatur

Andoh, T., Chargaff, E.: Formation and fate of abnormal ribosomes of E. coli cells treated with 5-fluorouracil.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1181-1189 (1965)

Ansfield, F.J., Ramirez, G., Davis, H.L., Jr., Korbitz, B.C., Vermund, H., Gollin, F.F.: Treatment of advanced cancer of the head and neck.
Cancer 25, 78-82 (1970)

Ansfield, F.J., Ramirez, G., Korbitz, B.C., Davis, H. L., Jr.: Five-drug therapy for advanced breast cancer. A phase I study.
Cancer Chemother. Rep. 55, 183-187 (1971 a)

Ansfield, F.J., Ramirez, G., Skibba, J.L., Bryan, G.T., Davis, H.L., Wirtanen, G.W.: Intrahepatic aterial infusion with 5-fluorouracil.
Cancer, 28, 1147-1151 (1971 b)

Bateman, J.R., Pugh, R.P., Cassidy, F.R., Marshall, G. J., Irwin, L.E.: 5-Fluorouracil given once weekly: comparison of intravenous and oral administration.
Cancer 28, 907-913 (1971)

Berry, R.J., Evans, H.J., Robinson, D.M.: Perturbations in X-ray dose response in vitro with time after plating: a pitfall in the comparison of results obtained by different laboratories using asynchronous cell systems.
Exp. Cell Res. 42, 512-522 (1966)

Bhuyan, L., Scheidt, L.G., Fraser, T.J.: Cell cycle phase specificit of antitumor agents.
Cancer Research 32, 398-407 (1972)

Bosch, L., Harbers, E., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro.
Cancer Res. 18, 335-343 (1958)

Bruce, W.R., Meeker, B.E.: Comparison of the sensitivity of hematopoietic colony-forming cells in different proliferative states to 5-fluorouracil.
J. nat. Cancer Inst. 38, 401-405 (1967)

Bujard, H., Heidelberger, C.: Fluorinated pyrimidines. XXVII. Attempts to determine transcription errors during the formation of fluorouracil-containing messenger ribonucleic acid.
Biochemistry 5, 3339-3345 (1966)

Chaudhuri, N.K., Montag, B.J., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-^{14}C and 5-fluoroorotic acid-2-^{14}C in vivo.
Cancer Res. 18, 318-328 (1958)

Clarkson, B., O'Connor, A., Winston, L., Hutchison, D.: The physiologic disposition of 5-fluoro-uracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in man.
Clin. Pharmacol. Ther. 5, 581-610 (1964)

Cohen, S.S., Flaks, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R., Lichtenstein, J.: The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44, 1004-1012 (1958)

Cohen, J.L., Krant, M.J., Shnider, B.I., Matias, P.I., Horton, J., Baxter, D.: Radiation plus 5-fluoruracil (NSC-19893): clinical demonstration of an additive effect in bronchogenic carcinoma.
Cancer Chemother. Rep. 55, 253-258 (1971)

Danneberg, P.B., Montag, B.J., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. IV. Effects on nucleic acid metabolism in vivo.
Cancer Res. 18, 329-334 (1958)

De Kloet, S.R.: Effects of 5-fluorouracil and 6-azauracil on the synthesis of ribo-nucleic acid and protein in Saccharomyces carlsbergensis.
Biochem. J. 106, 167-178 (1968)

Druckrey, H., Küpfmüller, K.: Dosis und Wirkung. In: Die Pharmazie, 8. Beiheft, 1. Ergänzungsband.
W. Saenger: Berlin (1949) S. 515-645

Duschinsky, R., Pleven, E., Heidelberger, C.: The synthesis of 5-fluoropyrimidines.
J. Amer. chem. Soc. 79, 4559-4560 (1957)

Ford, D.K., Yerganian, G.: Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture.
J. Natl. Cancer Inst. 21, 393-402 (1958)

Harbers, E., Chaudhuri, N.K., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. VIII. Further biochemical and metabolic investigations.
J. biol. Chem. 234, 1255-1262 (1959)

Hartmann, K.-U., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. VIII. Inhibition of thymidylate synthetase.
J. biol. Chem. 236, 3006-3013 (1961)

Heidelberger, C., Leibmann, K.C., Harbers, E., Bhargava, P.M.: The comparative utilization of uracil-2-^{14}C by liver, intestinal mucosa and Flexner-Jobling carcinoma in the rat.
Cancer Res. 17, 399-404 (1957)

Heidelberger, C., Kaldor, G., Mukherjee, K.L., Danneberg, P.B.: Studies on fluorinated pyrimidines. XI. In vitro studies on tumor resistance.
Cancer Res. 20, 903-909 (1960 a)

Heidelberger, C., Boohar, J., Kampschoer, B.: Fluorinated pyrimidines. XXIV. In vitro metabolism of 5-trifluoromethyluracil-2-^{14}C and 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine-2-^{14}C.
Cancer Res. 25, 377-381 (1965)

Heidelberger, C.: Fluorinated Pyrimidines and Their Nucleosides. Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, Part 2. Editors: Sartorelli, A.C., Johns, D.G.
Springerverlag (Berlin-Heidelberg-New York) (1975)

Hills, D.C., Horowitz, J.: Ribosome synthesis in E. coli treated with 5-fluorouracil.
Biochemistry 5, 1625-1632 (1966)

Houlabek, V.: The composition of tobacco mosaic virus protein after the incorporation of 5-fluorouracil into the virus.
J. molec. Biol. 6, 164-166 (1963)

Hug, O.: Medizinische Strahlenkunde. Biophysikalische Einführung für Studierende und Ärzte.
Springerverlag (Berlin-Heidelberg-New York) (1974)

Iwabuchi, M., Okata, E., Kono, M., Osawa, S.: The efekt of 5-fluorouracil on the ribosome formation in E. coli.
Biochim. biophys. Acta (Amst.) 114, 83-94 (1966)

Jacobs, E.M., Reeves, W.J., Wood, D.A., Rugh, R., Braunwald, J., Bateman, J.R.: Treatment of cancer with weekly intravenous 5-fluorouracil.
Cancer 27, 1302-1305 (1971)

Lahiri, S.R., Boileau, G., Hall, T.C.: Treatment of metastatic colorectal carcinoma with 5-fluorouracil by mouth.
Cancer 28, 902-906 (1971)

Liebecq, C., Peters, R.A.: The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle.
Biochim, biophys. Acta (Amst.) 3, 215-230 (1949)

Lozeron, H.A., Gordon, M.P.: Ultraviolet sensitization and photoreactivation of tobacco mosaic virus ribonucleic acid containing 5-fluorouracil.
Biochemistry 3, 507-510 (1964)

Lozeron, H.A., Gordon, M.P., Gabriel, T., Tautz, W., Duschinsky, R.: The photochemistry of 5-fluorouracil.
Biochemistry 3, 1844-1850 (1964)

Madoc-Jones, H., Bruce, W.R.: On the mechanism of the lethal action of 5-fluorouracil on mouse L cells.
Cancer Res. 28, 1976-1981 (1968)

Mauro, F., Madoc-Jones, H.: Age response of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs.
Cancer Res. 30, 1397-1408 (1970)

Mellett, L.B.: The constancy of the product of concentration and time. In: Antineoplastic and immunosuppressive agents. Ed.: A.C. Sartorelli and D. G. Johns.
Springer: Berlin-Heidelberg-New York (1975)

Mukherjee, K.L., Boohar, J., Wentland, D., Ansfield, F.J., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. XVI. Metabolism of 5-fluorouracil-2-^{14}C and 5-fluoro-2'-deoxyuridine-2-^{14}C in cancer patients.
Cancer Res. 23, 49-66 (1963 a)

Mukherjee, K.L., Curreri, A.R., Javid, M., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. XVII. Tissue distribution of 5-fluorouracil-2-^{14}C and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in cancer patients.
Cancer Res. 23, 67-77 (1963 b)

Mukherjee, K.L., Heidelberger, C.: Studies on fluorinated pyrimidines. IX. The degradation of 5-fluorouracil-6-^{14}C.
J. biol. Chem. 235, 433-437 (1960)

Reyes, P.: The synthesis of 5-fluorouridine-5'-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammaliam origin. I. Some properties of the enzyme from P 1534 J mouse leukemie cells.
Biochemistry 8, 2057-2062 (1969)

Reyes, P., Hall, T.C.: Synthesis of 5-fluorouridine-5'-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammalian origin. II. Correlation between the tumor levels of the enzyme and the 5-fluorouracil-promoted increase in survival of tumor-bearing mice.
Biochem. Pharmacol. 18, 2587-2590 (1969)

Robins, M.J., Naik, S.R.: Nucleic acid related compounds. III. A facile synthesis of 5-fluorouracil bases and nucleosides by direct fluorination.
J. Amer. chem. Soc. 93, 5277-5278 (1971)

Rosen, B., Rothman, F., Weigert, M.G.: Miscoding caused by 5-fluorouracil.
J. molec. Biol. 44, 363-375 (1969)

Rueckert, R.R., Mueller, G.C.: Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequences of thymidine deficiency.
Cancer Res. 20, 1584-1591 (1960)

Rutman, R.J., Cantarow, A., Paschkis, K.E.: Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilisation of uracil-2-^{14}C by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.
Cancer Res. 14, 119-134 (1954)

Skipper, H.E.: The effect of chemotherapy on the kinetics of leukemic cell behaviour.
Cancer Research 25, 1544-1550 (1965)

Trott, K.-R., Bölükbasi, E.: The effect of fractionated exposure to Thio-TEPA upon Chinese Hamster Cells in vitro. Institut für Biologie der GSF, D-8042 Neuherberg und Strahlenbiologisches Institut der Universität München, Federal Republic of Germany. (1976)

Umeda, M., Heidelberger, C.: Fluorinated pyrimidines. XXX. Comparative studies of fluorinated pyrimidines with various cell lines.
Cancer Res. 28, 2529-2538 (1968)

Wempen, I., Fox, J.J.: Pyrimidines. II. Synthesis of 6-fluorouracil.
J. med. Chem. 7, 207-209 (1964 a)

Williams, A.C., Klein, E.: Experiences with local chemotherapy and immunotherapy in premalignant and malignant skin lesions.
Cancer 25, 450-462 (1970)

Wolberg, W.H.: The effect of 5-fluorouracil on DNA thymine synthesis in human tumors.
Cancer Res. 29, 2137-2144 (1969)

Lebenslauf

Ich wurde am 7. April 1953 als Sohn des Arztes Josef Johann Mayerhofer und seiner Ehefrau Kunigunde, geb. Weiß, in Vilsbiburg geboren.

1959 besuchte ich die erste Klasse Volksschule in Vilsbiburg. 1963 trat ich in das neusprachliche Gymnasium des Staatlichen Landschulheimes Marquartstein ein. 1972 bestand ich das Abitur am Hans-Carossa-Gymnasium in Landshut.

Von 1972 bis 1973 studierte ich an der Universität Tübingen Humanmedizin. Danach setzte ich mein Studium an der Ludwig Maximilians-Universität in München fort, wo ich am 29. August 1975 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.

Den schriftlichen Teil des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 9./10. Oktober 1978, den mündlichen Teil mit Wahlfach Orthopädie am 19. Oktober 1978.

Am 2.11.1978 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Seit 1.2.79 bin ich chir. Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Vilsbiburg.